

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Development and Optimization of a New Synthesis Process for a New Third Generation Tetracycline Antibiotic

João Filipe de Sousa Chainho

Mestrado em Química Tecnológica

Versão Pública

Dissertação orientada por:

Doutora Catarina Dias

Professor Doutor Manuel Matos Lopes

2019

I. Agradecimentos

Este trabalho foi revelador dos objetivos que eu não sabia que queria atingir e dessa forma cabe--me agradecer a todos os que estiveram presentes neste caminho por vezes atribulado.

À minha Professora Maria José Lourenço que, na altura, escolheu este estágio tendo-me em conta e por ter acreditado que este tema era o que mais se adequava a mim (que de facto foi!) e ao meu orientador e Professor Manuel Matos Lopes cujo orientando andava desaparecido a maior parte do tempo.

À Ana e à Lena por animarem as manhãs no laboratório e animarem qualquer pessoa com a sua simpatia e disponibilidade.

Ao Zé Luís que dava continuidade aos meus ensaios e a quem dei algumas dores de cabeça, pelo que há um número indeterminado de cervejas em dívida.

Aos meus colegas do departamento de ID: João e Beatriz por me terem ajudado com as análises aqui descritas e com o manuseamento do HPLC, Henrique por me ter ajudado com os hidrogenadores e a montar certas experiências e à Natália por me ter ensinado vários métodos para separar peças de vidro entaladas (é mais útil e importante do que aquilo que soa!).

Ao Doutor Carlos pelas sugestões que desenvolvi na tese e na elucidação de muitas dúvidas.

Por fim, à minha orientadora Catarina cuja paciência infindável permitiu o esclarecimento de muitas dúvidas e questões existenciais, mencionando também a importância da sua contribuição para esta tese.

II. Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar a síntese de uma nova tetraciclina. Cada etapa foi analisada de forma a identificar os seus problemas. Outras experiências de interesse para o processo foram realizadas, como a identificação do papel de certos reagentes e intermediários. Nestas últimas, foi explorada a neutralização do cloridrato da matéria prima usada, além de provar internamente a epimerização inversa da tetraciclina em estudo e identificação do papel da base usada na terceira etapa da reação.

No primeiro passo, que compreende uma substituição aromática de Tscherniac supereletrofilica, a seletividade foi melhorada e o intermediário que afetou negativamente a reação geral foi reduzido para um terço de sua quantidade usual, por meio de um aumento da quantidade de um dos reagentes e diluição da reação. Uma rota alternativa descoberta foi o uso da matéria prima enquanto base livre, em vez do seu cloridrato, que também foi bem-sucedida. No segundo passo, foram encontrados problemas após a otimização da etapa inicial. Isto causou um aumento na quantidade de intermediários típicos de uma reação incompleta e desacelerou a reação, além de aumentar o perfil de impurezas na próxima etapa. Isto foi corrigido ao aumentar a quantidade de solução de um dos reagentes, assim como a temperatura da mesma. No passo final, um *work up* complexo e, posteriormente, *oiling out* foram resolvidos através da redução da quantidade de extrações necessárias e da evaporação da fase orgânica até à secura antes da precipitação. A otimização do processo global foi bem-sucedida, conseguindo um rendimento global mássico (corrigido com o doseamento) de 36% versus a média da indústria de 31%. As otimizações sugeridas aqui são baseadas nos efeitos positivos que estas tiveram na reação global e nos seus resultados. Além disso, o trabalho aqui descrito contribuiu para uma melhor compreensão dos fenómenos subjacentes à reação global, que serão valiosos para a melhoria contínua dos desafios industriais na produção deste antibiótico.

III. Resumo alargado

Este trabalho insere-se na otimização e desenvolvimento do processo de síntese de um novo membro da família das tetraciclinas. O processo de síntese deste novo API tem três passos reacionais.

No primeiro passo ocorre uma substituição eletrofílica da N-hidroximetilftalimida à estrutura da matéria-prima, que se trata de uma tetraciclina de segunda geração, em que diferentes posições desta última reagem, formando uma mistura de intermediários (intermediário A). O papel de um dos produtos secundários que se forma em menor quantidade e a forma como afeta a reação de forma global ainda era desconhecida. Para averiguar o seu papel, sintetizou-se primeiramente um pó de intermediário A em que o seu principal constituinte era o produto em causa. Usou-se este pó nos passos seguintes (intermediário B e produto final), com a advertência de que no segundo passo foi necessário alterar as condições normais devido à lentidão da mesma. O perfil cromatográfico mostrou-se semelhante ao de uma reação padrão. Utilizou-se depois este intermediário B no terceiro passo, resultando um produto final mais impuro que aquele normalmente obtido pelo procedimento normal. Daqui se concluiu que a presença deste intermediário em quantidades consideráveis é contraprodutiva por prolongar o tempo de reação e gerar mais impurezas na reação global.

Neste passo ainda, um dos intermediários ocorre em quantidades que variam entre 8-13% em lotes industriais e que no último passo gera matéria-prima em quantidades equivalentes. Isto no fundo equivale a que haja uma quantidade substancial de material de partida no produto final e que sejam dispensados tempo e recursos a removê-lo no processo de purificação, assim como a perda de rendimento associada. Dito isto, é indispensável reduzir a quantidade deste intermediário de forma a minimizar, por um lado, a quantidade de material de partida presente no produto final e agilizar o processo e, por outro, melhorar o rendimento. Isto foi conseguido de duas formas: aumentando a quantidade de um dos reagentes usado e de um dos solventes, outra foi o uso da matéria prima enquanto base livre, em vez do seu cloridrato, que e manter as condições padrão da reação. A contribuição cromatográfica do intermediário em questão desceu de 8-13% nos lotes industriais para cerca de 3%.

O segundo passo é uma reação simples de desproteção do intermediário A, em metilamina, transformando-o numa mistura de dois produtos denominada intermediário B. Industrialmente, este passo é o menos problemático, contudo, por via das mudanças efetuadas ao primeiro passo, foi necessário olhar para este passo e colmatar as falhas observadas. Uma das consequências da otimização do primeiro passo, além da redução do intermediário mais problemático, foi o aumento de outro que é mais lento a reagir e a sua transformação acarreta um ligeiro aumento de impurezas. Foi observado que nas condições normais de reação do segundo passo, este intermediário secundário não se transformava totalmente na mistura desejada, requerendo mais tempo de reação. Como tempos de reação muito longos (>20 h) são indesejados, a alternativa encontrada foi o aumento da quantidade de solução de metilamina aliada a um ligeiro aumento de temperatura.

O último passo trata-se da alquilação redutiva do intermediário B, seguido de um *work-up* que consiste em várias extrações líquido/líquido a diferentes gamas de pH, cujo principal objetivo é retirar a matéria prima que se forma. Após uma extração seletiva, a fase orgânica é depois concentrada e adicionada a uma mistura de anti-solventes, resultando na precipitação do produto final. Este *work-up* é a parte que requereu a maior parte da atenção em todo o trabalho,

visto se tratar dum processo complexo que se complicou mais aquando das otimizações nos passos anteriores.

Tendo em conta a otimização já descrita para os dois primeiros passos, que resultou numa diminuição significativa de matéria prima no produto final, começou-se por testar a eliminação de uma das gamas de pH à qual são feitas as extracções, de forma a diminuir perdas de produto final e diminuir a quantidade de solvente. Porém, esta solução originou o problema de *oiling out* que trouxe consequências ao nível do rendimento e do manuseamento do produto, pois era necessário repetir estes passos para reprocessar o óleo resultante e tentar a precipitação mais uma vez. O *oiling out* afeta inevitavelmente o rendimento e a qualidade do produto final. Sendo assim, várias condições foram testadas de forma a eliminar as extracções mencionadas (facilitando o processo e poupando recursos) e evitar o *oiling out*. Das várias condições testadas, uma sobressaiu-se no rendimento obtido e na prevenção de *oiling out*. Com tudo isto em conta, o rendimento global mássico aumentou de 31% (industrial) para 36% (otimizado).

Outras experiências menores, mas de relevância ao processo principal, foram concretizadas, nomeadamente a neutralização do cloridrato da matéria prima usada, além de provar internamente a epimerização inversa da tetraciclina em estudo e identificação do papel da base usada na terceira etapa da reação.

Este trabalho ajudou a melhorar o processo de síntese do API em estudo, assim como a expandir o conhecimento acerca deste processo em que se passou a saber os papéis de algumas variáveis previamente desconhecidos.

Palavras-chave: API, antibiótico, otimização, aminação redutiva, extração L/L.

IV. Abstract

The purpose of this work was to develop the synthesis of a new third generation tetracycline, starting from a second generation tetracycline. Each step was looked at and their problems identified, and other small experiments of interest to this process were performed, such as identifying the role of certain reagents and intermediaries. In the first step, an aromatic electrophilic substitution, the selectivity was improved and the intermediary that affected negatively the overall reaction was reduced to a third of its usual quantity by increasing the amount of the N-hydroxymethylphthalimide and diluting it. An alternate route of using the starting material's free base instead of its hydrochloride was also successfully explored as an alternative. In the second step, problems were encountered after optimizing the initial step, namely having an incomplete reaction. This was fixed by increasing the amount of solution of the deprotecting agent and temperature. Finally, the final product's synthesis challenges such as tedious work up and, later, oiling-out, were tackled through an alternative work up process. Optimization of the overall process was successful, achieving a global mass yield of 36 % vs the industry average of 31 %. Optimizations suggested here are based on how changes to the standard procedure ameliorated overall yields and reaction outcomes. In addition, this work here described contributed to a better understanding of the phenomena underlying this process, which will be valuable to a continuous improvement of industrial challenges in the production of this antibiotic.

Keywords: API, antibiotic, optimization, reductive amination, L/L extraction.

V. Index

1. Introduction	8
2. Materials and Methods	9
3. Results	10
4. Conclusions	11
5. References	12
6. Annexes	13

1. Introduction

Confidential.

2. Materials and Methods

Confidential.

3. Results

Confidential.

4. Conclusions

Confidential.

5. References

Confidential.

6. Annexes

Confidential.